

## PROTOCOLO FACs:

- Perfusión intracardíaca : 1 min. con PBS.
- Extraer la medula espinal, pesarla y ponerla en HBSS + 10% suero bovino (de alguno de los animales recoger también el bazo).
- Quitar las meninges y trocear con un bisturí o unas tijeras (en una placa de Petri con HBSS + suero).
- Recoger con una pipeta de 25 ml
- Pasar por el filtro de 140 micras (poner en una placa de Petri con HBSS + suero)
- Pasar la solución por el filtro de 70 micras (recogerlo en un tubo Falcon de 50ml).
- Rellenar el tubo hasta 25ml con HBSS + suero.
- Centrifugar a 1000 rpm : 10 min
- Resuspender en 25ml de HBSS (sin suero).
- Centrifugar a 1000 rpm : 10 min
- Resuspender en el MEDIO DE DIGESTIÓN: (10 ml/medula):
  - HBSS sin suero
  - DNAsa I ( 28 U/ml)
  - Colagenasa I (0,2mg/ml)
- Incubar 30 min a 37°C a ser posible en agitación.
- Añadir 1 volumen de HBSS + suero para parar la digestión (pej. 10ml de medio de digestión, añadir 10ml de HBSS + suero).
- Centrifugar a 1000 rpm : 10 min.
- Resuspender en HBSS sin suero (llenar el tubo hasta 25ml)
- Centrifugar a 1000 rpm : 10 min
- Gradiente de PERCOLL: en tubos de 15ml.
  - 7,9 ml de HBSS sin suero (calcular cuanto volumen tienes al resuspender el pellet y añadir hasta 7,9ml)
  - 2,1 ml de Percoll 1122g/ml (44,4ml Percoll+5ml PBS 10x+0,6ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)  
poner este mezcla encima de 3,5ml de Percoll 1088g/ml (31,2ml Percoll+ 5ml PBS 10x + 13,8 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)
- Centrifugar a 600g durante 20 min. (24°C sin freno)
- Quitar la mielina (queda encima del gradiente), succionando con una pipeta Pasteur esteril.
- Recoger la banda en la interfase con una pipeta Pasteur estéril. Ponerlo en tubos de 15ml. (A PARTIR DE AQUÍ MANTENER EN HIELO A 4°C)
- Diluir 6 veces en HBSS + suero
- Centrifugar a 1000 rpm : 10 min
- Resuspender en HBSS + suero.
- Centrifugar a 1000 rpm :5 min

- Resuspender en medio de FACs : PBS+ 2% suero.
- Contaje celular : 20 $\mu$ l de muestra + 20 $\mu$ l azul tripano: contar en la cámara de Newbauer (puntos refringentes = cells vivas). Contar dos cuadrantes.

$$\text{N}^\circ \text{ cells /ml} = \text{n}^\circ \text{ cells totales} / \text{n}^\circ \text{ cuadrantes contados} \times \text{dilución} \times 10.000$$

Separar:

- Tubos control (1 unstained+ controles negativos (single colour) dependiendo de cuantos colores vayas a utilizar.
- Tubos para marcaje de superficie (tubos del experimento).

## **MARCAJE DE SUPERFICIE:**

- Sembrar en placas de 96 pocillos con fondo **cónico** (250  $\mu$ l /pocillo).
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Incubar con Anticuerpos de superficie (1:400) (**30 min a 4°C**) 50 $\mu$ l /pocillo.
- Añadir 150  $\mu$ l de PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en 200  $\mu$ l de PBS de FACs (pasar a tubos de citometria)
- Añadir 100  $\mu$ l de PBS de FACs para tener 300  $\mu$ l finales.

## **Adquisición**

### **MARCAJE INTRACELULAR:**

- Sembrar en placas de 96 pocillos con fondo cónico (250µl / pocillo) .
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Incubar con Anticuerpos de superficie (1:50) (**30 min a 4°C**) 50µl /pocillo.
- Añadir 150 µl de PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en PBS + 2% suero.
- Centrifugar 800 rpm : 3min
- Resuspender en 200 µl de PBS de FACs (pasar a tubos de citometria)
- Añadir 100 µl de PBS de FACs para tener 300 µl finales.